

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-284589

(43)Date of publication of application : 07.10.2003

(51)Int.Cl.

C12Q 1/06

C12Q 1/68

G01N 21/77

G01N 21/78

G01N 33/02

G01N 33/48

(21)Application number : 2002-094561

(71)Applicant : D M L:KK

(22)Date of filing : 29.03.2002

(72)Inventor : YAMAMOTO ZENICHI
NIIKURA TOKIO

(54) METHOD FOR MEASURING MICROORGANISM IN FOOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a highly reliable method for detecting microorganisms in foods with which removal of free ATP, extraction of ATP from collected microorganism and detection of the extracted ATP are easily and quickly carried out by simple operation, and which is applicable to food samples and solid samples such as milk having high turbidity, milk products, soy milk and the like containing a large amount of protein.

SOLUTION: The method for detecting microorganisms in the foods is to filter the sample through a prefilter after pretreating the sample, filter the filtrate under reduced pressure through a membrane filter to collect and concentrate the microorganisms in the sample, remove solely free ATP ion the filtration membrane by washing with a detergent, add and ATP reagent to the microorganisms on the filtration membrane, add a luminescent reagent to the extract and detect generated amount of luminescence.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

06.04.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-284589
(P2003-284589A)

(43)公開日 平成15年10月7日(2003.10.7)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード*(参考)
C 1 2 Q 1/06		C 1 2 Q 1/06	2 G 0 4 5
1/68		1/68	Z 2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/77		G 0 1 N 21/77	D 4 B 0 6 3
21/78		21/78	C
33/02		33/02	
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002-94561(P2002-94561)

(22)出願日 平成14年3月29日(2002.3.29)

(71)出願人 000134039

株式会社ディエムエル

石川県金沢市中央通町5番12号

(72)発明者 山本 善一

石川県金沢市三馬1丁目294番地

(72)発明者 新蔵 登喜男

石川県金沢市中央通町5番12号 株式会社
ディエムエル内

(74)代理人 100083286

弁理士 三浦 邦夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 食品中の微生物の測定法

(57)【要約】

【目的】 遊離A T Pの除去、捕捉した微生物からのA T Pの抽出及び抽出A T Pの測定を簡単な操作で容易かつ迅速に行うことができ、濁度の高い牛乳及び乳製品、たんぱく質含量の高い豆乳等の食品試料や固形食品にも適用でき、信頼度が高い食品中の微生物の測定法を提供すること。

【構成】 食品試料を前処理してプレフィルターでろ過し、ろ液をメンブランフィルターで再び減圧ろ過して試料中の微生物をろ過膜上に捕捉濃縮し、ろ過膜上の遊離A T Pのみを洗浄剤で洗浄除去した後、ろ過膜上の微生物にA T P抽出試薬を加え、抽出液に発光試薬を添加し、生じる発光量を測定することを特徴とする食品中の微生物の測定法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 食品試料を前処理してプレフィルターでろ過し、ろ液をメンブランフィルターで減圧ろ過して試料中の微生物をろ過膜上に捕捉濃縮し、ろ過膜上の微生物に由来しない遊離 ATP を洗浄剤で洗浄除去した後、この微生物に ATP 抽出試薬を加え、抽出液に発光試薬を添加し、生じる発光量を測定することを特徴とする食品中の微生物の測定法。

【請求項 2】 上記前処理として、食品に必要な応じて滅菌蒸留水を添加した後、ホモジナイズし、凝集剤及びろ過促進剤を添加し、攪拌する操作を行う請求項 1 記載の微生物の測定法。

【請求項 3】 上記凝集剤がポリリン酸カリウム、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸カリウム、メタリン酸ナトリウム等の縮合リン酸塩である請求項 2 記載の微生物の測定法。

【請求項 4】 上記ろ過促進剤がエチレンジアミン四酢酸のアルカリ金属塩、トランス-1, 2-シクロヘキサジアミン四酢酸のアルカリ金属塩、グリコールエーテルジアミン四酢酸のアルカリ金属塩、ジエチレントリアミン五酢酸のアルカリ金属塩及びニトリロ三酢酸のアルカリ金属塩から選択された 1 種以上である請求項 2 記載の微生物の測定法。

【請求項 5】 上記プレフィルターとして、孔径 5 ~ 10 μm のろ過材を用いる請求項 1 記載の微生物の測定法。

【請求項 6】 上記メンブランフィルターが孔径 0.5 μm 以下の微細孔を有する多孔性親水性高分子膜である請求項 1 記載の微生物の測定法。

【請求項 7】 上記洗浄剤が 1 種又は 2 種以上の有機溶剤を含む滅菌蒸留水からなる請求項 1 記載の微生物の測定法。

【請求項 8】 上記有機溶剤がエチルアルコール等のアルコールまたはジメチルスルホキシド (DMSO) である請求項 7 記載の微生物の測定法。

【請求項 9】 上記 ATP 抽出試薬がジメチルスルホキシド (DMSO) を含む滅菌蒸留水である請求項 1 記載の微生物の測定法。

【請求項 10】 上記ジメチルスルホキシドの含有率が 15 ~ 20 容量%である請求項 9 記載の微生物の測定法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【技術分野】 本発明は、通常の ATP 法では微生物の測定が困難とされている固形食品、牛乳、乳製品等、遊離 ATP (体細胞 ATP) を多く含む食品中の微生物を迅速かつ容易に高感度で測定する方法に関する。

【0002】

【従来技術及びその問題点】 食品中の微生物の測定には、標準寒天平板法が一般的に用いられているが、この

方法では判定までに 24 ~ 48 時間という長時間を要するので、微生物汚染が発生した場合に、迅速な対応を採ることができない。また、より簡便で迅速な微生物の検出方法として、微生物中のアデノシン三リン酸 (ATP) の量をルミノメータを用いて発光量を測定し、これから微生物数を算出するバイオルミネッセンス (ATP 法) が知られている。しかし、この方法では、微生物数が少ない検体液の場合、例えば、 $10^3 \sim 10^4$ 個/ml 以下ではルミノメータの測定限界以下となり、検出できない。一方、ほとんどの食品の場合、微生物に由来しない遊離 ATP を含んでおり、この遊離 ATP 濃度は、微生物由来の ATP 濃度に比べて桁違いに高い場合が多く、これらの妨害を予め除去しないと、微生物中の ATP を正しく測定することはできないという問題点があった。これらの問題を解決するために、検体液のろ過や ATP 分解酵素であるアピラーゼなどを用いて微生物に由来しない遊離 ATP を予め分解してから、ATP 法を適用する方法が提案されている。しかしながら、遊離 ATP を短時間で分解するためには、測定試料中の ATP 分解酵素の濃度を十分に高くする必要があり、この分解酵素の濃度が高すぎると、次の工程で抽出した微生物由来の ATP の発光を抑制したり、測定濃度がゼロに近くなってしまうという問題が生じる。

【0003】 また、検体液をろ過して、その中に含まれている微生物をろ過材上に捕捉し、ろ過材とろ過材上の微生物に付着している ATP 分解試薬を洗い流し、微生物中の ATP を抽出する方法も提案されている。しかし、この方法は、ろ過の容易な食品試料 (アルコール飲料や調味料つゆなど) に限定され、市販の牛乳や乳製品のように、たんぱく質や脂質、無脂肪固形分を多量に含む濁度の高い試料には、ろ過が困難で適用できない。このようなろ過の困難な乳製品試料を希釈処理し、その希釈液中の微生物 ATP を測定する方法も提案されている。この方法では試料 0.1ml を採取し、これに処理液 0.1ml、希釈液 0.7ml、ATP 消去剤 0.1 ml を加えて混合し、その混合物 1.0 ml から 0.1 ml を測定チューブに分取して 30 分放置し、次に発光試薬 0.1ml を添加し、ルミノメータで発光量を測定する。これは、0.01 ml という極めて微量の試料中の微生物 ATP を測定しているので、発光量も極めて少ない。したがって、試薬ブランク値が常に発光量 (RLU) 50 以下の低い値でないと、正しい測定結果が得られない。そのため、使用する処理液、希釈液、抽出剤、高感度発光試薬の汚染の有無調査などが要求されるなど、問題点が多い。

【0004】

【発明の目的】 本発明は、遊離 ATP の除去、捕捉した微生物からの ATP の抽出及び抽出 ATP の測定を容易かつ迅速に行うことができ、しかも熟練を必要としない、食品中の微生物の測定法を提供することを目的とする。

【0005】

【発明の概要】本発明者らは、ろ過困難な試料、特に牛乳及び乳製品を迅速かつ容易にろ過するための有効な前処理として、凝集剤とろ過促進剤とを併用して添加すると、目詰まりを起こすことなく極めて短時間にろ過できることを見出し、また、ろ過膜上に付着している多量の遊離ATPのみを洗浄除去できる洗浄液を見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、食品試料を前処理してプレフィルターでろ過し、ろ液をメンブランフィルターで減圧ろ過して試料中の微生物をろ過膜上に捕捉濃縮し、ろ過膜上の微生物に由来しない遊離ATPを洗浄剤で洗浄除去した後、この微生物にATP抽出試薬を加え、抽出液に発光試薬を添加し、生じる発光量を測定することを特徴とする食品中の微生物の測定法を提供するものである。

【0006】

【発明の実施形態】本発明において、食品試料としては、特に限定はないが、例えば、牛乳や各種乳製品、たんぱく質含有量の高い豆乳などに適用することができる。また、固形食品には、滅菌蒸留水を添加した後、ホモジナイズして試料とするのが好ましい。本発明においては、食品試料に凝集剤及びろ過促進剤を添加し、攪拌する前処理を行い、ろ過を迅速容易にすることが好ましい。ここで、使用しうる凝集剤としては、縮合リン酸塩、例えば、メタリン酸のアルカリ金属塩（ナトリウム塩又はカリウム塩）、ポリリン酸カリウム、ポリリン酸ナトリウムなどが挙げられる。凝集剤の添加量は、食品試料の種類によって変動するが、一般に、食品試料1ml当たり0.01～0.5gで十分であり、例えば、市販の牛乳の場合、牛乳1ml当たり0.3～0.5gでよく、これを粉末で添加してもよいが、水溶液（例えば、50%水溶液）の形で添加すると、反応が迅速に進行する。

【0007】また、ろ過促進剤としては、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）のアルカリ金属塩、トランス-1,2-シクロヘキサジアミン四酢酸（CyDTA）のアルカリ金属塩、グリコールエーテルジアミン四酢酸（GEDTA）のアルカリ金属塩、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）のアルカリ金属塩、ニトリロ三酢酸（NTA）のアルカリ金属塩などが挙げられ、これらのうちから1種以上を選択することができる。ここで、アルカリ金属としては、ナトリウムあるいはカリウムが用いられる。これらのろ過促進剤は、一般には、キレート剤として用いられる化合物であるが、本発明において上記の凝集剤と併用すると、牛乳等の食品試料中に含まれるミネラル、例えば、カルシウムとキレート化合物

（水溶性）を作り、ろ過を容易にする。上記のようなろ過促進剤の添加量は、使用するろ過促進剤や食品の種類によって変動し、一義的に決定できないが、一般に、食品試料1ml当たり5～20mgで十分であり、EDTAのナトリウム塩の場合、市販の牛乳1ml当たり15～20

mgで十分である。

【0008】上記のように、凝集剤及びろ過促進剤を添加し、前処理した試料は、ろ過を行うことが可能となる。本明細書において、前処理した試料は、孔径5～10μmのろ過材、例えば、No. 1、No. 3、No. 5 A定量ろ紙のような高純度ろ紙をプレフィルターとして用いても、目詰まりを起こすことなく、容易にろ過できる。

【0009】本発明においては、上記のようにしてプレフィルターでろ過して得られたろ液を、次いで、メンブランフィルターで吸引ろ過する。メンブランフィルターは、孔径0.5μm以下、好ましくは孔径0.2～0.45μmの微細孔を有する多孔性親水性高分子膜であるのが好ましい。多孔性親水性高分子膜としては、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリビニリデンジフルオリド、ポリカーボネート等の高分子からなる分離膜が挙げられる。

【0010】上記のようなメンブランフィルターでろ過すると、微生物はろ過膜上に捕捉・濃縮される。このろ過膜及び微生物には、微生物に由来しない遊離ATPや発光物質も付着しているため、これらを洗浄剤で洗浄除去することが必要である。洗浄剤としては、1種又は2種以上の有機溶剤を含む滅菌蒸留水を用いるのが好ましい。ここで、有機溶剤としては、エチルアルコール等のアルコール、ジメチルスルホキシドなどが挙げられる。このような洗浄剤が含有する有機溶剤の割合は、有機溶剤の種類によって左右され、エチルアルコールの場合、エチルアルコールを10～20容量%含むのが好ましく、ジメチルスルホキシドの場合、ジメチルスルホキシドを1～8容量%の範囲で、4～5容量%含むのが好ましい。有機溶剤の量が少なすぎると、洗浄効果が不十分となり、また有機溶剤の量が多過ぎると、微生物由来のATPが一部抽出されることがあるので、好ましくない。

【0011】メンブランフィルターのろ過膜及びろ過膜上の微生物を上記のような洗浄剤で洗浄して微生物に由来しない遊離ATPや発光物質を除去した後、微生物の付着したメンブランフィルターを測定チューブへ移し、ATP抽出液を加える。ATP抽出試薬としては、ジメチルスルホキシドを含む滅菌蒸留水を用いるのが好ましい。ジメチルスルホキシドの含有率は、15～20容量%であるのが好ましい。ジメチルスルホキシドの割合が少なすぎると、ATP抽出率が急速に低下する。また、多すぎても発光量が低下する。

【0012】こうして得られた抽出液には、微生物由来のATPのみが含まれるから、これに発光試薬を添加し、ルミノメータで発光量を測定することにより微生物数を測定することができる。発光試薬は、特に制限はなく、通常、ルシフェラーゼとルシフェリンが用いられる。

【0013】

【実施例】次に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれによって制限されるものではない。なお、下記の参考例及び実施例で使用する発光試薬は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及び酢酸マグネシウムを主成分とし、Tricine緩衝液に溶解したものである。

【0014】参考例

大腸菌数が 2×10^4 個/ml、 2×10^5 個/ml、 2×10^6 個/ml及び 2×10^7 個/mlの大腸菌培養液をそれぞれ調製し、これにATP標準溶液を添加して遊離ATPとして 10^5 pMの測定試料とした。この4種類の測定試料各1mlを孔径0.5 μ m (直径25mm)のメンブランフィルター(材質：ポリテトラフルオロエチレン)で吸引ろ過し、メンブランフィルター上に付着している遊離ATPを15%エタノール溶液10mlずつで3回洗浄した。最後に滅菌蒸留水10mlで洗浄した後、メンブランフィルターを測定チューブに移し、メンブランフィルターに捕捉した大腸菌からATPを抽出するため、20%DMSO溶液0.2mlを加えて1分間放置した後、発光試薬0.1mlを加えてルミノメータで発光量を測定した。測定したATP濃度と大腸菌数は、 10^4 個/ml以上で良好な直線関係が成立した。比較のため、メンブランフィルターによるろ過及び15%エタノール溶液による洗浄を行わずに、各測定試料0.1mlを測定チューブに入れ、20%DMSO溶液0.2mlを加えて大腸菌からATPを抽出した後、発光試薬0.1mlを加え、ルミノメータでその発光量を測定した(比較例)。大腸菌数と測定されたATP濃度との関係を図1に示

洗浄液	洗浄量 (ml)	ATP 濃度 (pM)
滅菌蒸留水	20	6×10^4
滅菌蒸留水	40	5×10^4
滅菌蒸留水	60	3×10^4
10%エタノール	20	1×10^4
10%エタノール	40	4×10^3
10%エタノール	60	3×10^3
15%エタノール	20	2×10^3
15%エタノール	40	4×10^2
15%エタノール	60	3×10^2
20%エタノール	20	1×10^2
20%エタノール	40	1×10

【0017】実施例2

市販の牛乳5mlを30mlのビーカーに採取し、50%ヘキサメタリン酸ナトリウム水溶液4mlとエチレンジアミン四酢酸のナトリウム塩0.1gを加え、十分に攪拌(約1分間)した後、直ちにNo. 5Aの標準定量ろ紙でろ過した。ろ液を滅菌蒸留水で10mlに希釈し、希釈液から2mlを分取してメンブランフィルター(孔径0.5 μ m、直径25mm、材質ポリテトラフルオロエチレン)で減圧ろ過した。次いで、15%エタノール10mlずつで5回洗浄し、メンブランフィルター上に付着・残存し

し、発光量(RLU)とATP濃度との関係を図2に示す。

【0015】実施例1

市販の牛乳(後記の実施例2におけるM社の牛乳：微生物由来のATP濃度 3×10^2 pM)10mlを30mlのビーカーに採取し、50%ヘキサメタリン酸ナトリウム水溶液8mlとエチレンジアミン四酢酸のナトリウム塩0.15gを加え、十分に攪拌(約2分間)した後、直ちにNo. 5Aの標準定量ろ紙でろ過した。ろ液を滅菌蒸留水で50mlに希釈し、希釈液から5mlを分取してメンブランフィルター(孔径0.5 μ m、直径25mm、材質：ポリテトラフルオロエチレン)で減圧ろ過した。次いで、滅菌蒸留水と濃度の異なるエタノール溶液で液量を変えて洗浄し、メンブランフィルター上に付着・残存している遊離ATPを除去した。メンブランフィルターを測定チューブに移し、20%DMSO溶液0.2mlを加えて微生物由来のATPを抽出した。次に、発光試薬0.1mlを添加して発光量(RLU)を測定した。結果を表1に示す。この結果から、滅菌蒸留水のみの洗浄では多量の遊離ATPが残存したため、実際の微生物由来のATP濃度より著しく多量のATP濃度が測定されたが、15%エタノール40ml以上、20%エタノール20ml以上の洗浄では遊離ATPは、ほぼ除去できているため、ほぼ実際の微生物由来のATP濃度が測定されることが判明した。

【0016】

【表1】

ている遊離ATPを除去した。メンブランフィルターを測定チューブに移し、20%DMSO溶液0.2mlを加えて微生物由来のATPを抽出(約1分間)した。次に、発光試薬0.1mlを添加して発光量(RLU)を測定した。結果を表2に示す。比較のため、従来法で用いられるATP消去剤(ATP分解酵素)を加えて遊離ATPを分解(30分放置)した後、発光量を測定した。結果を表2に示す。

【0018】

【表2】

試料	測定法	A T P 濃度 (pM)
M社牛乳	ろ過洗浄	3×10^2
M社牛乳	A T P 消去剤添加	2×10^2
Y社牛乳	ろ過洗浄	4×10^2
Y社牛乳	A T P 消去剤添加	3×10^2

【0019】

【発明の効果】本発明によれば、遊離A T Pの除去、捕捉した微生物からのA T Pの抽出及び抽出A T Pの測定を簡単な操作で容易かつ迅速に行うことができ、濁度の高い牛乳及び乳製品試料や固形食品でも適用できる。また、本発明によれば、多量のたんぱく質やミネラルを含む過困難な豆乳等の食品中の微生物由来のA T Pを低

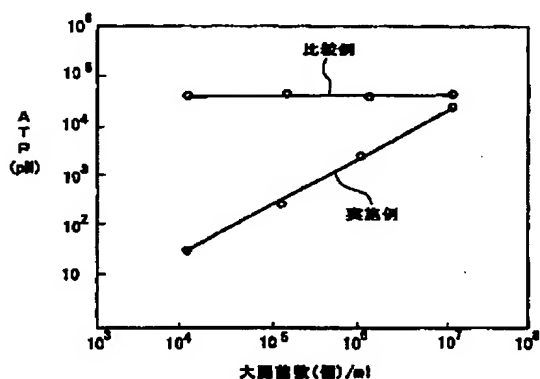
濃度まで良好に測定することができる。

【図面の簡単な説明】

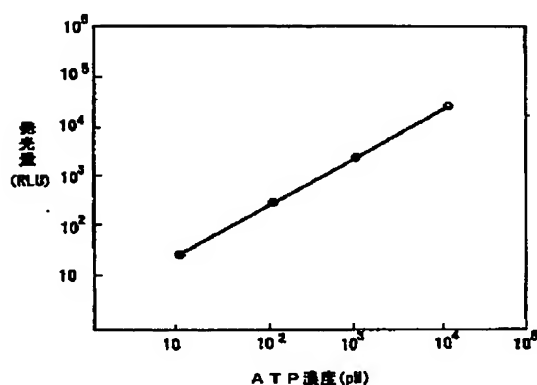
【図1】参考例で測定した大腸菌数とA T P濃度の関係を示すグラフである。

【図2】参考例で測定した発光量とA T P濃度との関係を示すグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7
G 0 1 N 33/48

識別記号

F I
G 0 1 N 33/48

ターマート (参考)
M

Fターム(参考) 2G045 AA28 CB21 FB13
2G054 CA21 CE02 EA01 EA02
4B063 QA01 QQ05 QQ16 QQ63 QR02
QR48 QR50 QR52 QR57 QR74
QR84 QS12 QX02